



# メカニカルストレス下における骨細胞アポトーシス とp53、CCN2の関与

著者	吉澤 光弘
号	44
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	歯博第760号
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/00097039">http://hdl.handle.net/10097/00097039</a>

氏 名（本籍）： 吉 澤 光 弘

学 位 の 種 類： 博 士 （ 歯 学 ）

学 位 記 番 号： 歯 博 第 7 6 0 号

学位授与年月日： 平成 28 年 3 月 25 日

学位授与の要件： 学位規則第 4 条第 1 項該当

研究科・専攻： 東北大学大学院歯学研究科（博士課程）歯科学専攻

学位論文題目： メカニカルストレス下における骨細胞アポトーシスと p53, CCN2 の関与

論文審査委員：（主査）教授 市 川 博 之  
教授 若 森 実 教授 山 本 照 子

## 論文内容要旨

矯正治療における歯の移動では、圧迫側における骨吸収と牽引側における骨添加・形成が起こり、骨リモデリングが絶えず行われている。その際、圧迫側では破骨細胞が、牽引側では骨芽細胞が主役となって働いているが、骨組織に最も多く存在する骨細胞もメカノセンサーとして骨リモデリングに関与しており、さらに骨細胞のアポトーシスが骨吸収に重要な役割を果たしている可能性が示唆されている。しかしながら、骨リモデリングと骨細胞および骨細胞のアポトーシスの関係についての詳細については不明な点が多い。一方、CCN2 はメカニカルストレスに反応することが知られており、骨細胞においてもメカニカルストレスにより発現が誘導され、アポトーシスを惹起することが報告されている。さらに、がん抑制遺伝子である p53 はアポトーシスを誘導することでも知られており、肝細胞において CCN2 の発現を誘導することが報告されているが、メカニカルストレス下における骨細胞のアポトーシス誘導において p53 と CCN2 の関与については明らかになっていない。そこで本研究では、マウス頭蓋骨圧縮力負荷モデルおよび骨細胞様細胞株 MLO-Y4 に圧縮力を負荷し、メカニカルストレス下における骨細胞のアポトーシスに対する p53, CCN2 の関与を *in vivo*, *in vitro* で検討した。その結果、*in vivo* における p53 の免疫染色において、p53 はマウス頭頂骨骨細胞に発現し、圧縮力負荷 0 時間後（対照群）と比較して、圧縮力負荷 3 時間後で有意に上昇し、圧縮力負荷 6 時間後では圧縮力負荷 3 時間後に比べ有意に減少し、対照群と同レベルまで減少した。また、CCN2 の免疫染色において、p53 と同様に CCN2 発現骨細胞は対照群と比較して、圧縮力負荷 3 時間後で有意に上昇し、圧縮力負荷 6 時間後では圧縮力負荷 3 時間後に比べ有意に減少し、対照群と同レベルまで減少した。さらに、TUNEL 染色において、陽性骨細胞率は対照群と比較して、圧縮力負荷 3 時間後では有意差を認めなかったが上昇し、圧縮力負荷 6 時間後では対照群と比較して有意に増加した。一方、*in vitro* においてタンパク質発現量を検索した結果、p53 および活性型である Phospho-p53(Ser15) の発現量は圧縮力負

荷後に増加傾向を示した。CCN2 の発現量は、p53 およびその活性化の発現量と同様に圧縮力負荷後より増加傾向を示した。また、アポトーシス誘導因子 Bax の発現量も圧縮力負荷後より増加傾向を示した。一方、アポトーシス関連因子 Caspase-3 の発現量は圧縮力負荷後より時間依存的に増加傾向を示した。さらに、p53 のインヒビターを用いて p53 の活性を抑制すると、圧縮力負荷 4 時間後において、圧縮力負荷により増加した p53, Phospho-p53(Ser15), CCN2, Bax および Caspase-3 の発現量は抑制された。これらの結果より、骨細胞への圧縮力負荷は p53 の発現および活性化, CCN2 の発現を誘導し、アポトーシスを促進するカスパーゼシグナルを活性化することが示唆された。

## 審査結果要旨

矯正治療における歯の移動では、圧迫側における骨吸収と牽引側における骨添加・形成が起こり、骨リモデリングが絶えず行われている。その際、圧迫側では破骨細胞が、牽引側では骨芽細胞が主役となって働いているが、骨組織に最も多く存在する骨細胞もメカノセンサーとして骨リモデリングに関与しており、さらに骨細胞のアポトーシスが骨吸収に重要な役割を果たしている可能性が示唆されている。しかしながら、骨リモデリングと骨細胞および骨細胞のアポトーシスの関係についての詳細については不明な点が多い。一方、CCN2 はメカニカルストレスに反応することが知られており、骨細胞においてもメカニカルストレスにより発現が誘導され、アポトーシスを惹起することが報告されている。さらに、がん抑制遺伝子である p53 はアポトーシスを誘導することでも知られており、肝細胞において CCN2 の発現を誘導することが報告されているが、メカニカルストレス下における骨細胞のアポトーシス誘導において p53 と CCN2 の関与については明らかになっていない。そこで本研究では、マウス頭蓋骨圧縮力負荷モデルおよび骨細胞様細胞株 MLO-Y4 細胞に圧縮力を負荷し、メカニカルストレス下における骨細胞のアポトーシスに対する p53, CCN2 の関与を *in vivo*, *in vitro* で検討している。その結果、*in vivo* における p53 の免疫染色において、p53 はマウス頭頂骨骨細胞に発現し、圧縮力負荷 0 時間後（対照群）と比較して、圧縮力負荷 3 時間後で有意に上昇し、圧縮力負荷 6 時間後では圧縮力負荷 3 時間後に比べ有意に減少し、対照群と同レベルまで減少する。また、CCN2 の免疫染色において、p53 と同様に CCN2 発現骨細胞は対照群と比較して、圧縮力負荷 3 時間後で有意に上昇し、圧縮力負荷 6 時間後では圧縮力負荷 3 時間後に比べ有意に減少し、対照群と同レベルまで減少する。さらに、TUNEL 染色において、陽性骨細胞率は対照群と比較して、圧縮力負荷 3 時間後では有意差を認めないが上昇し、圧縮力負荷 6 時間後では対照群と比較して有意に増加する。一方、*in vitro* においてタンパク発現量を検索した結果、p53 および活性型である phospho-p53(Ser15) の発現量は圧縮力負荷後に増加傾向を示す。CCN2 の発現量は、p53 およびその活性化の発現量と同様に圧縮力負荷後より増加傾向を示す。また、アポトーシス誘導因子 Bax の発現量も圧縮力負荷後より増加傾向を示す。一方、アポトーシス関連因子 Caspase-3 の発現量は圧縮力負荷後より時間依存的に増加傾向を示す。さらに、p53 のインヒビターを用いて p53 の活性を抑制すると、圧縮力負荷 4 時間後において、圧縮力負荷により増加した p53, Phospho-p53(Ser15), CCN2, Bax および Caspase-3 の発現量は抑制される。これらの結果より、骨細胞への圧縮力負荷は p53 の発現および活性化, CCN2 の発現を誘導し、アポトーシスを促進するカスパーゼシグナルを活性化することが示唆される。

以上のことから、本論文は、骨リモデリングのメカニズムに関する理解を大きく前進させるものと評価でき、臨床的にも大きな意義があると判断される。よって本論文は博士（歯学）の学位授与に値するものと認める。